

明 細 書

発明の名称

g p 1 2 0 に親和性を有するペプチド

技術分野

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(humanimmunodeficiency virus:H I V)の最外殻を構成する g p 1 2 0 分子に対して親和性を有するペプチドに関するものである。

背景技術

H I V 感染症に対する治療法としては、ヌクレオシド誘導体である 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (A Z T) に代表される如く、主に化学療法が用いられている。上記 A Z T 或いはその後開発されたプロテアーゼ阻害剤による治療法によって、H I V 感染者の延命効果は見られたものの、化学療法自体に起因する様々な問題は依然として回避されていない。

かかる問題としては、第 1 に、長期投与により慢性毒性が表れること；第 2 に、治療中に薬剤耐性 H I V 株が出現すること；第 3 に、延命効果が見られた患者に悪性腫瘍が多発すること；第 4 に、治療の最終目標である免疫応答の回復が得られないこと；第 5 に、治療効果のモニター方法がないこと等が挙げられる。この様に化学療法は、H I V 感染を根本的に治療し得る治療法とはなり得ないことから、ワクチンの開発が期待されている。

一般にワクチンと言えば、ウイルス等の微生物を化学処理することにより、その構造を変えことなく不活性化したもの（不活性化ワクチン）；病原性を失った弱毒株や天然痘ウイルスに対する牛痘ウイルス等の様に、ヒトに致死的作用を及ぼさない類似株（生ワクチン）が使用されている。しかしながら、H I V そのものは、元来弱毒株であるにもかかわらず、宿主細胞に一旦進入すると長期間滞在し得、次第に該宿主細胞の機能を破壊することが知られており、しかも H I V

の宿主細胞が、主に免疫機能を司るリンパ球であること；更にHIVが凍結乾燥血液製剤を介して血友病患者に蔓延したこと等を考慮すれば、不活性化・弱毒化のいずれかの途を選択するにせよ、HIVそのものをワクチンに用いることは、安全性の面で問題が多い。

従って、HIVワクチンの開発に当たっては、ウイルス最外殻の一部を使ってペプチドワクチンを作製することにより感染を防止するのが理想的である。

この様な観点から、多くの研究者が、ウイルス最外殻を構成するgp120分子のエピトープ解析を行っており、上記gp120分子のエピトープとしてV3領域(3rd hypervariable region)に注目したが、この領域は非常に変異の激しい領域であった[Palker T.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2709-2713, 1988; Rusche J.R., et al., ibid 85:3198-3202, 1988; Goudsdmit J., et al., ibid 85:4478-4482, 1988; Matsushita S., et al., J Virol. 62:2107-2114, 1988]。その後、この領域の一部を用いてペプチド抗原を作製し、猿を用いたHIV感染阻止実験[Emini E.A., et al., Nature 355: 728-730, 1992]が行われたが、有効な臨床結果はまだ報告されていない。

また、上記ペプチド抗原の免疫源性を高める工夫もされている(Tam et al., 特表平 3-503539 号)が、V3領域等のエピトープとして好適なV領域の大部分は、変異や欠失が頻繁に生じることから、所望とするワクチンを未だ得るに至っていない。

更に、V3領域の一部を抗原に作製した抗体を使って、HIVのリンパ球感染阻止を狙った所謂中和抗体の開発も行われている。例えば特願昭 63-171385 号公報には、上記領域の部分ペプチドを抗原として用い、マウスでモノクローナル抗体を作製し、そのFab'をタンパク質レベルで、或いは遺伝子工学的手法により結合させて、最終的にヒト抗体分子とマウス抗体分子をハイブリッドした抗HIVキメラ抗体を作製する方法が報告されている。しかしながら、この様な中和抗体にしても、HIVのリンパ球への感染阻止能は実験室レベルのものに過ぎず、実用上、有用な中和抗体は未だ得られていないのが現状である。

一方、前述した通り、化学療法では薬剤耐性や副作用発生等の問題があること

から、かかる問題のない血漿交換療法により、H I Vを生体から除去しようという考えもある。具体的には、血漿交換用に使われる濾過膜のポアサイズを小さくして該H I Vを除去する方法が考えられるが、H I Vは約 70nm とかなり小さいことから、ポアサイズを均一にすることが困難であること；また、血漿濾過時における目詰まりが生じること等の可能性があり、その結果、濾過膜の耐圧性が劣化する等、解決すべき技術的課題が多い。そこで、H I Vに特異的な親和性を持つリンパ球由来のCD 4タンパク質を血漿交換用吸着担体に利用する方法も考えられるが、CD 4は高圧滅菌により変性し、親和性を喪失する為、医療用具として使用することはできない。また、上記CD 4に代わり、H I Vに親和性のある高分子ポリマーや、色素リガンドの如く高圧滅菌耐性のものを使用する方法もあるが、これらは元々、H I Vに対する特異性がない為、H I Vが吸着する前に血液成分が該ポリマー等に非特異的に吸着してしまい、H I Vの吸着が阻害されてしまうので使用することはできない。

この様に、H I V治療剤の開発を目的として、ワクチンや中和抗体を作製する研究が盛んに行われているが、未だ有用な治療剤は得られていない。

この様な現状に着目し、本発明者らは、抗体と同等か、或いはそれ以上にg p 1 2 0に強い特異性を有し、しかも耐高圧滅菌性にも優れたペプチドを開発し、既に出願を済ませている（特願平 8-351474 および特願平 8-351475）。このペプチドは、基本的に3個のアミノ酸配列からものであるが、その後の研究により、当該ペプチドのg p 1 2 0に対する親和性は、それに連なるアミノ酸の種類や数により低下することが分かった。そこで、より安定性に優れたペプチドの提供が切望されている。

発明の開示

本発明は上記事情に着目してなされたものであり、その目的は、H I Vの最外殻を構成するg p 1 2 0分子に対して親和性を有しており、しかも安定性にも優れた新規なペプチド、及び該ペプチドを用いた様々な利用態様を提供することにある。

図面の簡単な説明

Fig. 1 は、実施例 8 の結果を示すグラフである。

Fig. 2 は、実施例 15 の結果を示す電子顕微鏡写真である。

発明を実施する為の最良の形態

上記課題を解決することのできた本発明の第 1 のペプチドとは、

式 (1) : $H-A1-A2-A3-A4-A5-R$

(式中、

H は、水素原子を示し、

A1 は、アスパラギン酸、リジン、バリン、グルタミン酸、グリシン、
アスパラギン、またはチロシンの残基、

A2 は、バリン、アスパラギン酸、トリプトファン、リジン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、またはチロシンの残基、

A3 は、リジン、バリン、アスパラギン酸、アルギニン、アラニン、またはトリプトファンの残基

A4 は、アラニン、トリプトファン、グリシンの残基、

A5 は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、またはチロシンの残基、

R は、カルボキシル基由来の OH または酸アミド基由来の NH_2 である)
で表される gp120 に対して親和性を有するペプチドであるところに要旨を有するものである。

即ち、本発明の第 1 のペプチドは、上記 A1、A2、A3、A4 および A5 からなる 5 個のアミノ酸配列を基本構成とするペプチドであり、この様なアミノ酸配列を含むペプチドは、全て本発明の範囲に包含される。従って、

式 (2) : $A1'-A2-A3-A4-A5-R$

(式中、

A 1' は、アスパラギン酸、リジン、バリン、グルタミン酸、グリシン、
アスパラギン、またはチロシンの残基、若しくは、該アミノ酸を
始端として、そのN末端側に任意のアミノ酸が配列したポリペプチ
ド残基、

A 2、A 3、A 4、A 5およびRは前と同じ意味)

で表される g p 1 2 0 に対して親和性を有するペプチドや、或いは、

式 (3) : $H-A1-A2-A3-A4-A5'-R'$

(式中、

A 5' は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、
スレオニン、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、
リジン、アルギニン、フェニルアラニン、トリプトファン、
プロリン、またはチロシンの残基、若しくは、該アミノ酸を始端と
して、そのC末端側に任意のアミノ酸が配列したポリペプチド残基、

H、A 1、A 2、A 3およびA 4は前と同じ意味)

で表される g p 1 2 0 に対して親和性を有するペプチドも、全て本発明の一態様
であると言うことができる。

また、上記課題を解決することのできた本発明の第2のペプチドとは、

式 (4) : $H-a1-a2-a3-a4-a5-R$

(式中、

Hは、 水素原子を示し、

a 1は、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、グリシン、トリプト
ファン、ヒスチジン、またはアスパラギン酸の残基、

a 2は、アルギニン、チロシン、トリプトファン、アラニン、バリン、グル
タミン、ヒスチジン、またはリジンの残基、

a 3は、リジン、チロシン、アルギニン、グルタミン酸、メチオニン、
またはトリプトファンの残基、

a 4は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、

スレオニン、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、フェニルアラニン、またはトリプトファンの残基、

a 5 は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンの残基、

R は、カルボキシル基由来のOHまたは酸アミド基由来のNH₂である)
で表される g p 1 2 0 に対して親和性を有するペプチドであるところに要旨を有するものである。

即ち、本発明の第2のペプチドは、上記 a 1、a 2、a 3、a 4 および a 5 からなる5個のアミノ酸配列を基本構成とするペプチドであり、この様なアミノ酸配列を含むペプチドは、全て本発明の範囲内に包含される。従って、

式(5) : a 1' - a 2 - a 3 - a 4 - a 5 - R

(式中、

a 1' は、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、グリシン、トリプトファン、ヒスチジン、またはアスパラギン酸の残基、若しくは、該アミノ酸を始端としてそのN末端側に任意のアミノ酸が配列したポリペプチド残基、

a 2、a 3、a 4、a 5 および R は前と同じ意味)
で表される g p 1 2 0 に対して親和性を有するペプチドや、或いは、

式(6) : H - a 1 - a 2 - a 3 - a 4 - a 5'

(式中、

a 5' は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンの残基、若しくは、該アミノ酸及びアミノ酸誘導体を始端として、そのC末端側に任意のアミノ酸が配列したポリペ

チド残基、

H、a 1、a 2、a 3およびa 4は前と同じ意味)

で表されるg p 1 2 0に対して親和性を有するペプチドも、全て本発明の一態様であると言える。

また、上記第1若しくは第2のペプチドに、官能基を有する高分子化合物及び／又は医薬活性物質が結合した化合物または医薬として許容されるその塩類も本発明の範囲内に包含される。

尚、これらのペプチド性化合物や化合物を含有するものは、換言すれば、g p 1 2 0に対する親和剤と呼ぶことができる。

更に、上記ペプチドまたは医薬として許容されるその塩類、並びに薬学的に許容される担体及び／又は医薬活性物質を含有する組成物も本発明の範囲内に包含される。また、上記のペプチドを用いてH I V等のウイルスを検出、診断、除去等する様々な態様（例えば、H I V診断検査薬若しくは該検査薬を含む検査キットに利用したり、H I V吸着除去剤に利用したり、血漿交換療法に利用したりする等の態様）も本発明の範囲内に包含される。

尚、本発明に用いられる「ペプチド」には、ペプチドのC末端がC O O Hであるものの他、酸アミドやエステル等になっているものも含み、また、結合するアミノ酸の数にしても、特に明記しない限り、アミノ酸が1 0個以下のオリゴペプチドから、それ以上のポリペプチドまで包含するものとする。

また、上記ペプチドを構成するアミノ酸には、官能基を保護基で保護したアミノ酸誘導体も含まれる。この様なアミノ酸誘導体として、ペプチド骨格そのものを代えることなく側鎖の官能基が置換若しくは修飾されたもの；炭素鎖の鎖長を代えたもの等、各種アミノ酸に対応した保護アミノ酸誘導体が市販されているが、本発明では、これらの各種アミノ酸を使用することができる。例えばチロシンの誘導体として、クロル基を側鎖に持つ 2,6-dichloro-L-tyrosine、フェニルアラニンの側鎖のフェニル基のp位の水酸基をニトロ基に置換した p-Nitro-L-phenylalanine、該水酸基をクロル基に置換した 4-chloro-L-phenylalanine 等が挙げられ、また、バリンの誘導体としては、Norvaline:N- α -L-norvaline、或い

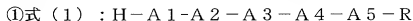
は MeVal:N- α -methyl-L-valine 等が挙げられる。

本発明者らは、従来の HIV 治療剤を用いたのでは、ワクチンにしても中和抗体にしても、実用レベルの成果が何ら得られなかった理由として、生体が抗原として認識できる HIV の領域が、その最外殻を構成する gp120 の変異の激しい V 領域であることに最大の問題があるという観点に基づき、生体が作製する抗体に代わって、gp120 に親和性を有するペプチドを得ることに着目し、鋭意検討してきた。その結果、抗体と同等か、或いはそれ以上に gp120 に強い特異性を有し、しかも耐高压滅菌性にも優れたペプチドを開発し、既に出願を済ませている（特願平 8-351474 および特願平 8-351475）。

ところがその後の研究により、上記ペプチドの gp120 に対する親和性は、それに連なるアミノ酸の種類や数により低下するという知見が得られた。そこで、より安定性に優れたペプチドを提供すべく更に検討を重ねた結果、本発明を完成したのである。

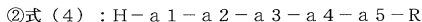
尚、本発明における「親和性」とは、静電力や、水素結合、Van der Waals 力、疎水性結合等の共有結合以外の弱い相互作用が合わさった特異的な強い結合を表す。

本発明のペプチドは、上記の様に構成されており、基本的には、



(式中、A1, A2, A3, A4, A5 および R は前と同じ意味)

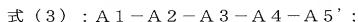
或いは、



(式中、a1, a2, a3, a4, a5 および R は前と同じ意味)

で表される 5 個のアミノ酸残基から成るペプチドである。これらのペプチドは、この様に独立した分子であっても良いし、或いはポリペプチド中に、

上記①のペプチドにおいては、



のアミノ酸配列が、

また、上記②のペプチドにおいては、

式(5) : $a1' - a2 - a3 - a4 - a5$; 若しくは

式(6) : $a1 - a2 - a3 - a4 - a5'$

(式中、 $A1'$, $A2$, $A3$, $A4$, $A5'$, $a1'$, $a2$, $a3$, $a4$,
 $a5'$ は夫々前と同じ意味)

のアミノ酸配列が、夫々この順序でN末端側から配されたものであっても構わない。勿論、そのなかには、 $A1' - A2' - A3' - A4' - A5'$ や $a1' - a2' - a3' - a4' - a5'$ がこの順序で繰り返し配してなるペプチドも含まれる。要するに、上述した5個のアミノ酸残基からなるペプチドを含み、gp120に対して親和性を有するペプチドは、全て本発明の範囲内に包含されるのである。

本発明のペプチドは、固相合成法等の公地の方法により製造することができる。例えば、 $A1 - A2 - A3 - A4 - A5$ からなる本発明第1のペプチドを合成する場合、 $A5$ がグリシン残基の場合は、N-保護グリシンのカルボキシル基をカルボキシル基と結合し得る官能基をカップリングさせた不溶性樹脂の様な担体に結合させた後、 $A2$ から $A5$ までの各保護アミノ酸を固相合成法により順次結合させ、次いで、上記不溶性樹脂およびアミノ酸の保護基を脱離させることにより、所望のペプチドを得ることができる。尚、 $A5$ のアミノ酸残基のカルボキシル基末端は、フリー（即ち、 R が $-OH$ に相当）であっても良いし、或いは酸アミド（即ち、 R が $-NH_2$ に相当）に変換されていても良い。また、 $A5$ のカルボキシル基末端は、必要に応じて該カルボキシル基に結合しているスパーサーのカルボキシル基と共に、合成高分子や生体高分子等、官能基を有する繁用の高分子化合物と結合しても良い（後記する）。尚、上記固相合成法に使用されるアミノ酸は、共通してL体であっても良いし、或いは共通してD体であっても構わない。より好ましくはL体である。

上記の場合において、固相合成法に使用される担体としては、そのアミノ基を介してC末端のN-保護グリシンのカルボキシル基、または該カルボキシル基と結合可能であり、しかも結合後に脱離可能なものであれば制限されず、例えば、

クロロメチル樹脂（クロロメチル化スチレンージビニルベンゼン共重合体等）やオキシメチル樹脂（オキシメチルスチレンージビニルベンゼン共重合体等）等が挙げられる。また、カルボキシル基と結合し得る官能基及び該カルボキシル基を有するスペーサーを介して、アミノ基を有する不溶性樹脂に結合させた4ー（オキシメチル）フェニルアセタミドメチル樹脂等の樹脂、ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、アミノ基を有する不溶性樹脂であるベンズヒドリルアミン樹脂、メチルベンズヒドロキシリルアミン樹脂、アミノメチルフェノキシメチル樹脂、ジメトキシベンズヒドリルアミン（DMBHA）樹脂、およびこれらの誘導体等が挙げられる。このうち、ベンズヒドリルアミン樹脂、メチルベンズヒドロキシリルアミン樹脂、アミノメチルフェノキシメチル樹脂、およびDMBHA樹脂は、結合後、開裂することにより直接酸アミドが得られる。収率の観点からすれば、アミノメチル樹脂の使用が好ましい。

また、カルボキシル基と結合し得る官能基および該カルボキシル基を有するスペーサーとしては、例えばグリシンのカルボキシル基をpーカルボキシメチルベンジルエステルに変換し得るものが挙げられる。

また、上記「保護アミノ酸」とは、官能基を公知の方法により保護基で保護したアミノ酸を意味し、各種の保護アミノ酸が市販されている。本発明のペプチドを合成するには、以下に示す保護基のいずれかを使用するのが好ましい。

例えばアミノ酸の α -アミノ基の保護基としては、Boc（tーブチルオキシカルボニル）またはFmoc（9ーフルオレノメチルオキシカルボニル）；リジンの ϵ -アミノ基の保護基としては、Z（ベンジルオキシカルボニル），Cl・Z（2ークロロベンジルオキシカルボニル），Boc，Npys（3ーニトロー2ーピリジンスルフェニル）；チロシンの水酸基の保護基としては、Bzl（ベンジル），Cl₂・Bzl（2，6ージクロロベンジル）或いはt-Bu（tーブチル）が挙げられるが、該チロシンの水酸基は上記保護基で保護されていなくても良い；アルギニンのグアニジノ基の保護基としては、Tos（トシル），NO₂（ニトロ），Mtr（4ーメトキシー2，3，6ートリメチルベンゼンスルホニル）またはpmc（2，2，5，7，8ーペンタメチルクロマノー6ーースル

ホルル) ; グルタミン酸のカルボキシル基の保護基としては、Bz l エステル、
t-Bu エステル、cHx (エステルサイクロヘキシルエステル) ; グルタミン
のアミド基の保護基としては、Trt (トリチル) が挙げられるが、該保護基で
保護されていないと良い ; トリプトファンのインドール基の保護基としては、
ホルミル基またはBoc が挙げられるが、該保護基で保護されていないと良い。
これらの保護基は、ペプチドの合成条件に応じて最も適切なものを、適宜選択し
て使用することができる。

保護アミノ酸の結合は、通常の縮合法、例えばDCC (ジクロロヘキシルカルボ
ジイミド) 法 (R.B. Merrifield: Biochemistry, 3, 1385, 1964) , D I C D I
(ジイソプロピルカルボジイミド) 法 (D. Sarantakis, et al: Biochem. Biop
hys. Res. Commun., 73, 336, 1976) , 活性エステル法 (F. Weygand, et al
: Z. Naturforsch., B, 21, 1141, 1966) , 混合或いは対称酸無水物法 (D.
Yamashiro, et. al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 4945, 1974) , カル
ボニルジイミダゾール法, DCC-HOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾー
ル) 法 (Keonig, W., et al.; Chem. Ber., 103: 788, 1970) , ジフェニルホス
ホリルアジド法等に従って行うことができるが、なかでもDCC法、DCC-H
OBt法、D I C D I-HOBt法、対称酸無水物法を使用することが好ましい。
これらの縮合反応は、通常、ジクロロメタンやジメチルホルムアミド等の有機溶
媒、またはそれらの混合液中で行われる。

尚、 α -アミノ基の保護基の脱離試薬としては、トリフルオロ酢酸/ジクロロ
メタン、HCl/ジオキサン、ピペリジン/ジメチルホルムアミド等が用いられ、
使用する保護基の種類により適宜選択することができる。また、合成の各段階に
おける縮合反応の進行の程度は、ニンヒドリン反応法 (E. Kaiser, et al, Anal.
Biochem., 34: 595, 1970) により確認することができる。

この様にして、上式で表されるアミノ酸配列を有する保護ペプチド樹脂を得た
後、不溶性樹脂およびアミノ酸の保護基を脱離させることにより、所望のペプ
チドを得ることができる。具体的には、例えば、不溶性樹脂としてクロロメチル樹
脂誘導体を用いた場合にはアニソールを添加してフッ化水素で処理すれば良い。

また、不溶性樹脂としてベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、DMBHA樹脂 (Funakoshi, S., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 198:382, 1988) を用いた場合には、フッ化水素、TFMSA (トリフルオロメタンスルホン酸)、TMSOTF (トリメチルシリルトリフルラート)、またはTMSBr (トリメチルシリルプロミド) 等で処理することにより、該樹脂および保護基を同時に脱離させることができる。

この様にして得られたペプチドは、各種クロマトグラフィー (ゲル濾過、イオン交換、分配、吸着、逆相)、電気泳動、限外濾過等の公知手段により単離精製することができる。

また本発明では、上記ペプチドを遺伝子組換え法によって得られる類似蛋白質 (抗体、レセプター、酵素等の活性中心や結合ドメイン) で置換させたものも、本発明のペプチドとして用いることができる。例えば、ヒト型抗 gp120 抗体を遺伝子組換え法により製造する場合には、米国特許第 114632 号に記載の方法に準じて、ヒトイムノグロブリンの V 遺伝子領域中、エпитーブの認識に係していると言われている VH31 から 35 番までの CDR (complementarity determination region) - 1 の全領域、CDR-2 の VH50 から 52 番まで、及び/又は CDR-2 の VH58 から 60 番までの 3 つの超可変群 (Hypervariable cluster) のアミノ酸 (Ohno, S., Mori, N. & Matunaga, T.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82, 2945, 1985) に、上記本発明のペプチドを導入する等すればよい。

この様に上記本発明のペプチドを、その目的に応じて遺伝子組換え法により置換させることにより、gp120 結合型の蛋白質を作製することができる。

本発明第 1 のペプチドの具体例としては例えば表 1 ~ 2 に示すものが、また、本発明第 2 のペプチドの具体例としては例えば表 3 ~ 4 に示すものが夫々挙げられる。尚、表中の * は、後記する実施例に記載の方法に基づいて凝集試験及び中和試験を実施した場合、凝集若しくは中和が見られたことを意味する。尚、表 1 の No. 24 は本発明第 1 のペプチドにも該当するし、本発明第 2 のペプチドにも該当するものである。

表 1

No.			Al	A2	A3	A4	A5	凝集試験	中和活性
1			Asp	Val	Lys	Ala	Gly	*	
2			Asp	Lys	Val	Ala	Gly	*	
3			Lys	Val	Asp	Ala	Gly	*	
4			Val	Lys	Lys	Ala	Gly		*
5			Asp	Asp	Lys	Ala	Gly	*	*
6			Lys	Asp	Asp	Ala	Gly	*	
7			Val	Asp	Asp	Ala	Gly	*	
8			Asp	Val	Asp	Ala	Gly	*	
9			Val	Val	Lys	Ala	Gly	*	*
10			Val	Val	Asp	Ala	Gly	*	
11			Lys	Val	Val	Ala	Gly	*	
12			Asp	Asp	Val	Ala	Gly		*
13			Asp	Asp	Asp	Ala	Gly		*
14			Val	Lys	Val	Ala	Gly		*
15			Asp	Tyr	Lys	Ala	Ala	*	*
16			Asp	Phe	Lys	Ala	Gly	*	
17			Asp	Trp	Lys	Ala	Gly	*	
18			Asp	Val	Arg	Ala	Gly	*	
19			Glu	Val	Lys	Ala	Gly	*	
20	Gly	Gly	Asp	Val	Lys	Ala	Gly	*	
21		Gly	Asp	Val	Lys	Ala	Gly	*	
22			Val	Ile	Asp	Ala	Gly	*	
23			Val	Leu	Asp	Ala	Gly	*	
24			Gly	Val	Lys	Ala	Gly	*	
25			Asp	Val	Lys	Trp	Ala	*	
26			Asp	Val	Lys	Gly	Lys	*	
27			Asp	Val	Lys	Gly	Trp	*	

表 2

No.			A1	A2	A3	A4	A5	凝集試験	中和活性
28			Asp	Val	Ala	Ala	Gly	*	
29			Asp	Val	Lys	Gly	Leu	*	
30			Asp	Val	Lys	Gly	Pro	*	
31			Asp	Val	Lys	Ala	Val	*	
32			Asp	Val	Lys	Ala	Ile	*	
33			Asp	Val	Lys	Ala	Ser	*	
34			Asp	Val	Lys	Ala	Thr	*	
35			Asp	Val	Lys	Ala	Met	*	
36			Asp	Val	Lys	Ala	Gln	*	
37			Asp	Val	Lys	Ala	Asn	*	
38			Asp	Val	Lys	Ala	His	*	
39			Asp	Val	Lys	Ala	Arg	*	
40			Asp	Val	Lys	Ala	Phe	*	

表 3

NO.		A1	A2	A3	A4	A5	凝集試験	中和活性
1		Phe	Tyr	Arg	Lys	Ala	*	*
2		Tyr	Arg	Arg	Ala	Ala		*
3		Trp	Trp	Glu	Ala	Ala	*	*
4		Tyr	Gln	Glu	Ala	Ala	*	
5		Gly	Tyr	Tyr	Lys	Ala	*	*
6		Trp	Trp	Lys	Ala	Ala	*	*
7		Tyr	Tyr	Arg	Ala	Ala		*
8		Phe	Arg	Lys	Ala	Ala		*
9		Tyr	Tyr	Lys	Lys	Ala	*	*
10		Tyr	Tyr	Lys	Leu	Leu		*
11		Tyr	Arg	Lys	Ala	Ala	*	*
12		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala	*	*
13		Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	*	*
14		Phe	Tyr	Arg	Ala	Ala		*
15		Tyr	Ala	Lys	Ala	Ala	*	*
16		Tyr	Tyr	Glu	Ala	Ala	*	
17		Tyr	Trp	Lys	Ala	Ala	*	
18	Gly	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala	*	
19		Trp	Tyr	Lys	Ala	Ala	*	
20		Tyr	Gln	Lys	Ala	Ala	*	
21		His	Tyr	Lys	Ala	Ala	*	
22		Tyr	Arg	Tyr	Ala	Ala	*	*
23		Tyr	Tyr	Met	Ala	Ala		*
24		Tyr	Val	Lys	Ala	Ala		*
25	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Lys	*	
26		Arg	Arg	Trp	Ala	Tyr	*	*
27	Arg	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala	*	

表 4

NO.		A1	A2	A3	A4	A5	凝集試験	中和活性
28		Tyr	Lys	Lys	Ala	Ala	*	
29		Tyr	His	Lys	Ala	Ala	*	*
30		Asp	Tyr	Lys	Ala	Ala	*	
31		Tyr	Tyr	Lys	Trp	Ala	*	
32		Tyr	Tyr	Lys	Gly	Ala	*	
33		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Gly	*	
34		Tyr	Tyr	Lys	Lys	Ala	*	
35		Tyr	Tyr	Lys	Val	Ala	*	
36		Tyr	Tyr	Lys	Ile	Ala	*	
37		Tyr	Tyr	Lys	Ser	Ala	*	
38		Tyr	Tyr	Lys	Thr	Ala	*	
39		Tyr	Tyr	Lys	Met	Ala	*	
40		Tyr	Tyr	Lys	Gln	Ala	*	
41		Tyr	Tyr	Lys	Asn	Ala	*	
42		Tyr	Tyr	Lys	His	Ala	*	
43		Tyr	Tyr	Lys	Phe	Ala	*	
44		Tyr	Tyr	Lys	Trp	Ala	*	
45		Tyr	Tyr	Lys	Arg	Ala	*	
46		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Val	*	
47		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ile	*	
48		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ser	*	
49		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Thr	*	
50		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Met	*	
51		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Gln	*	
52		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Asn	*	
53		Tyr	Tyr	Lys	Ala	His	*	
54		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Phe	*	
55		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Trp	*	
56		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Arg	*	

式中の各アミノ酸記号は、国際的に認められた三文字表示によるアミノ酸残基を示すものであり、その詳細は下記の通りである。

Tyr:チロシン

Lys:リジン

Trp:トリプトファン

Arg:アルギニン

Glu:グルタミン酸

Gln:グルタミン

His:ヒスチジン

Ala:アラニン

Phe:フェニルアラニン

Gly:グリシン

Met:メチオニン

Asp:アスパラギン酸

Asn:アスパラギン

Val:バリン

Ser:セリン

Cys:システイン

Thr:トレオニン

Ile:イソロイシン

Leu:ロイシン

Pro:プロリン

このようなアミノ酸配列を有するペプチドは、gp120に対して優れた親和性を有しており、以下に示す化合物または組成物の形態をとることによって、抗HIV剤として有効に用いることができる。

本発明の化合物は、上記ペプチドに、官能基を有する高分子化合物及び／又は医薬活性物質が結合したものであり、医薬として許容されるその塩類も本発明のなかに包含される。

ここで、「医薬として許容される塩類」としては、例えば以下の様な常用の無毒性の塩類が挙げられる。

①無機塩基等の塩基との塩として、アルカリ金属塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等）、アンモニウム塩；②有機塩基等の塩基との塩として、有機アミン塩（例えばトリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、エタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N' -ジベンジルエチレンジアミン塩等）；③無機酸等の酸との塩として、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸等；④有機酸等の酸との塩として、有機カルボン酸（酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、サリチル酸等）、有機スルホン酸（メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等）、酸性糖（グルクロン酸、ガラクトン酸、グルコン酸、アスコルビン酸等）。

また、本発明に用いられる「官能基を有する高分子化合物」は、本発明のペプチドと結合することのできる官能基を有するものであれば特に限定されないが、例えば以下のものが挙げられる。

（1）合成高分子化合物

上記高分子化合物としては、直鎖状ポリマー、分岐状ポリマー、環状ポリマー等任意のものが用いられ、例えばポリリジン、ポリグルタミン酸等のアミノ酸ホモポリマー、或いは環状ポリアミン、サイクロデキストリン、環状ペプチドの他、ポリスチレン、ポリプロピレン、ナイロン、シリカゲル、ポリエチレングリコール、セルロース、ポリアクリルアミド等の不溶性の固相担体を使用することができる。

このうち分岐状ポリマーは、ポリマー中の分子の一部が分岐することにより、単位当たりの官能基濃度が、通常の直鎖状ポリマーよりも高いものである。例えば Denkewalter により開示されたリジンコア等の様に、少なくとも2個以上の官能基を有するコア分子に由来する2本以上の同一分子鎖に基づくポリマー（米国特許No. 4, 289, 872号）、或いは Tomalia らによって提唱されている同一分子が連続的に反応することによりポリマーサイズが厳密な規則性を有

するスターバーストデンドリマー (Starburst dendrimer) の様なものであっても良いし、或いは、同一／異なった分子が不連続に反応することによりサイズが不規則に形成された分子であっても構わない。また、上記直鎖状／分岐状ポリマーは、充分な大きさを有する担体分子である必要はなく、通常はコアーとは認識されない様な 3 程度のモノマーを含むものも包含され、その大きさや導入数によって何ら制限されるものではない。但し、上式のペプチドを多数導入させる場合には、いずれのポリマーであっても、分岐数が多いポリマーの使用が推奨される。本発明のペプチドを上記したポリマーに結合させるに当たっては、分岐した官能基からそのまま直接的／間接的に、上記ペプチドを合成して伸長させても良いし、或いは、別途新規に合成したペプチドを、該ポリマーの官能基に直接的／間接的にコンジュゲートしても良い。

また、環状ポリアミン、サイクロデキストリン、環状ペプチド等の環状ポリマーを結合させるに当たっては、その同一官能基から上式のペプチドを直接合成して伸長させても良いし、或いは、別途新規に合成したペプチドを、該環状ポリマーの官能基に直接的／間接的に結合させても良い。また、シリカゲル等の不溶性担体を結合させるに当たっては、予め同一官能基を上記担体に導入した後、その官能基から直接上式のペプチドを合成して伸長させても良いし、或いは、別途新規に合成したペプチドを、該不溶性担体の官能基に直接的／間接的にコンジュゲートしても良い。また、この同一官能基を有する担体の大きさや形状は特に限定されず、球状、中空糸状、繊維状等の形状のものを使用目的により適宜選択して使用すれば良く、大きさや形状、導入された官能基の数によって何ら制限されるものではない。

(2) 生体高分子

上記生体高分子としては、例えばヘパリン、ヒアルロン酸、キトサン、キチン等の直鎖状多糖類；プロテオグリカン類、ペプチドホルモン；ゼラチン、アルブミン、抗体、抗体断片等のタンパク質等が挙げられる。

このうち直鎖状ポリマーの大きさは、使用目的に応じて適宜選択すれば良く、通常はポリマーとは認識されない様な 3 程度のモノマーを含むものも包含され、

その大きさや官能基の数によって何ら制限されるものではない。上式のペプチドをこの直鎖状ポリマーに結合させるに当たっては、その同一官能基から上記ペプチドを直接合成して伸長させても良いし、或いは、別途新規に合成したペプチドを、該直鎖状ポリマーの官能基に直接的／間接的にコンジュゲートしても良い。

また、ペプチドホルモンやタンパク質を結合させる場合には、上式のペプチドのいずれか末端にシステインを結合させて、上記ペプチドホルモン／タンパク質中のシステイン残基とS-S結合させるか、或いは、上式のペプチドの官能基とペプチドホルモン／タンパク質中の官能基を直接的／間接的にコンジュゲートしても良い。この様に、これらの結合方法は、使用目的に応じて適宜選択することができるし、また、その種類や上式のペプチドの導入数にしても同様である。

また、本発明に用いられる医薬活性物質としては、例えば抗HIV阻害剤として知られているヌクレオシド誘導体のAZT、HIVプロテアーゼ阻害剤として知られている3,4-Dihydroxy-2,5-di [N-methyl-(2-pyridylmethyl)carbamoyl]valylamino]-1,6-diphenylhexane 等があげられる。これらの医薬活性物質は、本発明のペプチドの活性部位を避けて直接的／間接的にコンジュゲートすることにより、副作用がなく、HIVに特異的な製剤を得ることができる。従って、この様な製剤は、HIVを特異的に治癒することのできる治療剤として有用である。

更に、上述した本発明のペプチドまたは医薬として許容されるその塩類、並びに薬学的に許容される担体及び／又は医薬活性物質を含有する組成物も本発明の範囲内に包含される。

上記の「薬学的に許容される担体」としては、賦形剤（崩壊剤、滑沢剤、増量剤等）、着色料、着香料、保存料、安定剤、その他常用の担体を適宜使用することができる。具体的には、結晶セルロース、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、軽質無水ケイ酸、食用色素、芳香性精油類等が挙げられる。

以下実施例に基づいて本発明を詳述する。ただし、下記実施例は本発明を制限するものではなく、前・後記の趣旨を逸脱しない範囲で変更実施することは全て

本発明の技術範囲に包含される。

実施例

合成例 1：本発明ペプチドにポリエチレングリコールを結合させた化合物

ポリエチレングリコール（MW. 20,000）の水酸基に無水コハク酸を反応させることによりカルボキシル基を導入した後、MBS（*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミド）と反応させることにより、マレイミド化したポリエチレングリコールを合成した。

それに、前記表 1 における No. 1 のペプチドの C 末端にシステインを導入したペプチドをペプチド結合させることにより、ペプチド-ポリエチレングリコール結合化合物を得た。得られた化合物をリン酸緩衝液で懸濁した後、gp120 結合担体によるアフィニティー、及びゲルクロマトグラフィー等を行って精製した。

合成例 2：本発明ペプチドにサイクロデキストリンを結合させた化合物

α -サイクロデキストリンの水酸基に無水コハク酸を反応させることによりカルボキシル基を導入した後、MBS（*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミド）と反応させることにより、マレイミド化したサイクロデキストリンを合成した。

一方、前記表 3 における No. 12 のペプチドの C 末端にシステインをペプチド結合させたペプチドを固相合成法で合成した後、得られたペプチドと、上記マレイミド化したサイクロデキストリンを反応させることにより環状生成物を得た。

合成例 3：本発明ペプチドに分岐状ポリマーを結合させた化合物（1）

MAPs（Multiple antigenic peptide）の N 末端アミノ酸側を前記表 1 における No. 1 のペプチドで伸長し、分岐状ポリマーに結合させた化合物を得た。得られた化合物をリン酸緩衝液で懸濁した後、gp120 結合担体によるアフィニティークロマトグラフィー、及びゲルクロマトグラフィー等を行って精製した。

合成例 4：本発明ペプチドに分岐状ポリマーを結合させた化合物（2）

MAPs の N 末端アミノ酸側を前記表 3 における No. 12 のペプチドで伸長し、分岐状ポリマーに結合させた化合物を得た。得られた化合物をリン酸緩衝液

で懸濁した後、g p 1 2 0 結合担体によるアフィニティクロマトグラフィー、及びゲルクロマトグラフィー等を行って精製した。

合成例 5：本発明ペプチドに A Z T を結合させた化合物

ブロモ酢酸にクロロギ酸イソブチルを反応させて混合無水とした後、これを A Z T の水酸基と反応させてエステル化することによりプロモアセチルエステル—A Z T を合成した。

一方、前記表 3 における No. 12 のペプチドの C 末端にシステインをペプチド結合させたペプチドを固相合成法で合成した後、得られたペプチドと、上記のプロモアセチルエステル—A Z T を反応させることにより、該ペプチドと A Z T の架橋生成物を得た。

合成例 6：本発明ペプチドに、不活性化したアルカリホスファターゼを結合した化合物

不活性化したアルカリホスファターゼ (A 1 p) に MBS (m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド) を反応させることにより、マレイミド化したアルカリホスファターゼを合成した。そして、そのマレイミド基に C 末端側にシステインを導入した前記表 3 における No. 8 のペプチドを結合させ、アルカリホスファターゼ結合化合物を得た。尚、アルカリホスファターゼの不活性化は、基質として p-ニトリルフェニルリン酸を用い、p-ニトリルフェノールの生成がないことを確かめることにより確認した。

合成例 7：本発明ペプチドをセファデックス 6 MB に結合させた吸着除去用担体 (1)

前記表 1 における No. 1 のペプチドを、スパーサーを介して予め活性化された Sephadex 4 B に共有結合させ、ペプチド/Sepharose 6 MB (1 μ mol of g p 1 2 0/ml in bed volum) を作製した。未反応のペプチドは、リン酸緩衝液を用いて室温で 10 分間 (12,000rpm) 遠心し、上清を吸引除去する操作を繰り返すことにより、未反応ペプチドを除去した。

合成例 8：本発明ペプチドをセファデックス 6 MB に結合させた吸着除去用担体 (2)

前記表 3 における No. 12 のペプチドを、スパーサーを介して予め活性化された Sephadex 4B に共有結合させ、ペプチド/Sepharose 6MB ($1\mu\text{mol}$ の $\text{g p } 120/\text{ml in bed volume}$) を作製した。未反応のペプチドは、リン酸緩衝液を用いて室温で 10 分間 ($12,000\text{rpm}$) 遠心し、上清を吸引除去するという操作を繰返すことにより除去した。

合成例 9 : 本発明ペプチドをセファデックス 4B に結合させた吸着除去用担体

前記表 3 における No. 12 のペプチドを、予め活性化された Sephadex 4B に共有結合させ、ペプチド/Sepharose 4B ($1\mu\text{mol}$ の $\text{g p } 120/\text{ml in bed volume}$) を作製した。未反応のペプチドは、リン酸緩衝液を用いて室温で 10 分間 ($12,000\text{rpm}$) 遠心し、上清を吸引除去するという操作を繰返すことにより除去した。

合成例 10 : 本発明ペプチドをセルロース系担体に結合した吸着除去用担体

前記表 3 における No. 12 のペプチドをペルオキシ化したセルロース担体と反応させてセルロースに共有結合させ、グリシンによってブロッキングした後、炭酸水素ナトリウム緩衝液 ($\text{pH } 8$) およびリン酸緩衝液 ($\text{pH } 4$) で充分洗浄し、作成した。

実施例 1 : 中和活性の測定

本実施例では、表 5 及び表 6 に示す種々のペプチドを使用し、HIV-1 に対する中和活性を調べた。

具体的には、96 ウェルのマイクロプレート中に、上記ペプチドを $50\mu\text{L}$; ウイルス液として、 200TCID_{50} の HTLV-III B (実験室株)、 200TCID_{50} の KK-1 株 (新鮮分離株、大竹徹ら、感染症雑誌、64, 1284~1294, 1990) を $50\mu\text{L}$; および正確に段階的に 2 倍希釈した上記ペプチドを $50\mu\text{L}$ 加えて混合した。尚、陽性対照としては AZT を使用した。

37°C で 30 分間反応させた後、更に 3×10^4 個の MT-4 細胞浮遊液を $100\mu\text{L}$ 加え、湿度 98%、5% CO_2 の存在下にて 37°C で 6 日間培養した。培養後、HIV-1 の増殖による細胞変性効果 (CPE)、即ち、薬剤を段階的に希釈して加え、感染した細胞が集合してアイランドを形成する状態 (フォーカ

ス形成)になったとき、この希釈倍率の前段階を中和活性量(感染阻止濃度)として判定した。これらの結果を表5及び表6に併記する。

表 5

No.	アミノ酸配列					抗 HIV 中和活性 (μ g/ml)	
	A1	A2	A3	A4	A5	HTLV-IIIB	KK-1
1	Val	Lys	Lys	Ala	Gly	Nglu	15.6
2	Asp	Asp	Lys	Ala	Gly	62.5	NE
3	Val	Val	Lys	Ala	Gly	31.3	NE
4	Asp	Asp	Val	Ala	Gly	500	NE
5	Asp	Asp	Asp	Ala	Gly	1,000	1,000
6	Val	Lys	Val	Ala	Gly	125	NE
7	Asp	Tyr	Lys	Ala	Ala	31.3	125

表6

No.	アミノ酸配列表					抗 HIV 中和活性 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	a1	a2	a3	a4	a5	HTLV-IIIB	KK-1
1	Phe	Tyr	Arg	Lys	Ala	250	125
2	Tyr	Arg	Arg	Ala	Ala	250	125
3	Trp	Trp	Glu	Ala	Ala	250	NE
4	Gly	Tyr	Tyr	Lys	Ala	31.3	125
5	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Ala	250	250
6	Phe	Arg	Lys	Ala	Ala	125	125
7	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Ala	312.5	312.5
8	Tyr	Tyr	Lys	Lcu	Leu	31.3	62.5
9	Tyr	Arg	Lys	Ala	Ala	312.5	156.3
10	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala	78.1	39.1
11	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	62.5	31.25
12	Phe	Tyr	Arg	Ala	Ala	NE	250-125
13	Tyr	Ala	Lys	Ala	Ala	500	NE
14	His	Tyr	Lys	Ala	Ala	NE	500
15	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Ala	31.25	31.25
16	Tyr	Tyr	Met	Ala	Ala	NE	125
17	Tyr	Val	Lys	Ala	Ala	NE	250
18	Arg	Arg	Trp	Ala	Tyr	39.1	39.1
19	Tyr	His	Lys	Ala	Ala	500	500

注) HTLV-IIIB: 実験室株

KK-1: 国内患者より分離した新鮮分離株

NE: 中和活性なし

表5および表6の結果から明らかな様に、本発明の要件を満足しないペプチド
はいずれもHIV-1株に対して中和活性を示さないのに対し、本発明の要件を

満足するペプチドはいずれも、HIV-1 株に対して優れた中和活性を示すことが分かった。尚、表 5 に示す本発明ペプチドは本発明第 1 のペプチドを、表 6 に示す本発明ペプチドは本発明第 2 のペプチドを夫々示す。また、これらの本発明ペプチドを用いれば、実験室株のみならず新鮮分離株を使用した場合にも優れた中和活性が認められることから、本発明のペプチドは、実験室レベルを超えた実用レベルでも極めて有用であることが示唆される。

実施例 2：凝集試験

本実施例では、表 7～10 に示すペプチドを使用し、gp120 に対する親和性を凝集試験により評価した。

1%活性化ラテックスビーズ (Polyscience 社製、粒子径 0.2 mm) 懸濁液およびアビジン (10 mg/mL) を等量混和した後、37℃で 1 時間反応させた。反応終了後、ウシ血清アルブミン (BSA, 1 mg/mL) を加え、未反応活性部位のブロッキング化を 37℃で 30 分間行った。次いで、遠心操作を繰り返すことにより未反応物を除去した後、ビオチニル化させた各ペプチド (10 mg/mL のリン酸緩衝液, pH 7.5) を添加し、37℃で 1 時間反応させることにより、抗 gp120 凝集検査試薬を得た。

陽性対照としては、バキュロウイルスで発現させたリコンビナント gp120 を標識した金コロイド (Immuno Diagnostics, Inc. 社製、粒子径 30 nm) を使用し、一方、陰性対照には、該当するリコンビナント gp120 をリン酸緩衝液に溶解したものを使用した。

凝集板に、上記凝集検査試薬と陽性対照を夫々 20 μ ずつ加えて混和し、10 分間静置した後、肉眼で凝集の有無を判定した。これらの結果を表 7～10 に併記する。尚、本実施例では、陽性対照の代わりに陰性対照を使用した場合には、凝集は見られなかったことを確認している。

表 7

	アミノ酸配列							凝集試験
No.			A1	A2	A3	A4	A5	gp120／C.G
1			Asp	Val	Lys	Ala	Gly	+++
2			Asp	Lys	Val	Ala	Gly	+
3			Lys	Val	Asp	Ala	Gly	+++
4			Asp	Asp	Lys	Ala	Gly	+
5			Lys	Asp	Asp	Ala	Gly	++
6			Val	Asp	Asp	Ala	Gly	++
7			Asp	Val	Asp	Ala	Gly	+
8			Val	Val	Lys	Ala	Gly	+
9			Val	Val	Asp	Ala	Gly	+++
10			Lys	Val	Val	Ala	Gly	+
11			Asp	Tyr	Lys	Ala	Ala	+
12			Asp	Phe	Lys	Ala	Gly	++
13			Asp	Trp	Lys	Ala	Gly	++
14			Asp	Val	Arg	Ala	Gly	+
15			Glu	Val	Lys	Ala	Gly	++
16	Gly	Gly	Asp	Val	Lys	Ala	Gly	+++
17		Gly	Asp	Val	Lys	Ala	Gly	++
18			Val	Ile	Asp	Ala	Gly	+
19			Val	Leu	Asp	Ala	Gly	+
20			Gly	Val	Lys	Ala	Gly	+
21			Asn	Val	Lys	Ala	Gly	+++
22			Asp	Val	Lys	Trp	Ala	+
23			Asp	Val	Lys	Gly	Lys	+
24			Asp	Val	Lys	Gly	Trp	+
25			Asp	Val	Lys	Gly	Leu	+
26			Asp	Val	Lys	Gly	Pro	+

表 8

	アミノ酸配列							凝集試験
No.			Al	A2	A3	A4	A5	gp120／C. G
27			Asp	Val	Lys	Ala	Val	+
28			Asp	Val	Lys	Ala	Ile	+
29			Asp	Val	Lys	Ala	Ser	+
30			Asp	Val	Lys	Ala	Thr	+
31			Asp	Val	Lys	Ala	Met	+
32			Asp	Val	Lys	Ala	Gln	+
33			Asp	Val	Lys	Ala	Asn	+
34			Asp	Val	Lys	Ala	His	+
35			Asp	Val	Lys	Ala	Arg	+
36			Asp	Val	Lys	Ala	Phe	+

表 9

No.	アミノ酸配列表						凝集試験
	a1	A2	a3	a4	a5	gd120/C. G	
1	Phe	Tyr	Arg	Lys	Ala		+
2	Trp	Trp	Glu	Ala	Ala		+
3	Tyr	Gln	Glu	Ala	Ala		+
4	Gly	Tyr	Tyr	Lys	Ala		+
5	Trp	Trp	Lys	Ala	Ala		+++
6	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Ala		+
7	Tyr	Arg	Lys	Ala	Ala		+
8	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala		+
9	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala		+
10	Tyr	Ala	Lys	Ala	Ala		+
11	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Ala		+
12	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ala		+
13	Gly	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala	+
14	Trp	Tyr	Lys	Ala	Ala		+
15	Tyr	Gln	Lys	Ala	Ala		++
16	His	Tyr	Lys	Ala	Ala		+
17	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Ala		++
18	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Lys	+
19	Arg	Arg	Trp	Ala	Tyr		+
20	Arg	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala	+
21	Tyr	Lys	Lys	Ala	Ala		+
22	Tyr	His	Lys	Ala	Ala		+
23	Asp	Tyr	Lys	Ala	Ala		+
24	Tyr	Tyr	Lys	Trp	Ala		+
25	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Ala		+
26	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Gly		+

表 10

No.		アミノ酸配列表					凝集試験
		a1	A2	a3	a4	a5	gp120／C.G
27		Tyr	Tyr	Lys	Lys	Ala	+
28		Tyr	Tyr	Lys	Val	Ala	+
29		Tyr	Tyr	Lys	Ile	Ala	+
30		Tyr	Tyr	Lys	Ser	Ala	+
31		Tyr	Tyr	Lys	Thr	Ala	+
32		Tyr	Tyr	Lys	Met	Ala	+
33		Tyr	Tyr	Lys	Gln	Ala	+
34		Tyr	Tyr	Lys	Asn	Ala	+
35		Tyr	Tyr	Lys	His	Ala	+
36		Tyr	Tyr	Lys	Phe	Ala	+
37		Tyr	Tyr	Lys	Trp	Ala	+
38		Tyr	Tyr	Lys	Arg	Ala	+
39		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Val	+
40		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ile	+
41		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ser	+
42		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Thr	+
43		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Met	+
44		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Gln	+
45		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Asn	+
46		Tyr	Tyr	Lys	Ala	His	+
47		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Phe	+
48		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Trp	+
49		Tyr	Tyr	Lys	Ala	Arg	+

注) gp120/C.G.: gp120 標識金コロイド

凝集強度 : +++ > ++ > + (凝集有り)、- (凝集なし)

表 7～10 の結果より、本発明のペプチドはいずれも gp120 に対して優れた親和性を有することが確認された。尚、表 7 及び表 8 に示す本発明ペプチドは本発明第 1 のペプチドを、表 9 及び表 10 に示す本発明ペプチドは本発明第 2 のペプチドを夫々示す。

実施例 3：本発明ペプチド中、A 4 及び A 5 の凝集能に及ぼす影響

表 7 における No. 1 のペプチドの鎖長を変えて、その凝集能に及ぼす影響を調べた。尚、凝集能は、実施例 2 と同様にして測定した。これらの結果を表 11 に併記する。表中、± は「痕跡程度に凝集」を意味する。

表 11

No.	アミノ酸の配列					凝集能
	A1	A2	A3	A4	A5	金コロイド標識 gp120
1	Asp	Val	Lys	Ala	Gly	+++
2	Asp	Val	Lys	Ala	-	+
3	Asp	Val	Lys	-	-	±

表 11 より、アミノ酸数が 3 個しかない No. 3 (a 4 及び a 5 のアミノ酸がない)、及びアミノ酸数が 4 個しかない No. 2 (a 5 のアミノ酸がない) は、いずれもアミノ酸数が 5 個の No. 1 に比べ、中和活性が著しく低下することが分かる。即ち、アミノ酸数の減少により中和活性は低下する傾向があり、なかでも、アミノ酸数が 3 個の No. 3 では中和活性を完全に消失した。

実施例 4：本発明ペプチド中、a 4 及び a 5 の中和活性に及ぼす影響

表 9 における No. 8 のペプチドの鎖長を変えて、その中和活性に及ぼす影響を調べた。尚、中和活性は、実施例 1 と同様にして測定した。これらの結果を表 12 に記載する。表中、NE は「陰性」を意味する。

表 1 2

No.	アミノ酸の配列					抗 HIV 中和活性 ($\mu\text{g/ml}$)	
	a1	a2	a3	a4	a5	HTLV-IIIB	KK-1
1	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala	78.1	39.1
2	Tyr	Tyr	Lys	Ala	-	NE	250
3	Tyr	Tyr	Lys	-	-	NE	NE

表 1 2 より、アミノ酸数が 3 個しかない No. 3 (a 4 及び a 5 のアミノ酸がない)、及びアミノ酸数が 4 個しかない No. 2 (a 5 のアミノ酸がない) は、いずれもアミノ酸数が 5 個の No. 1 に比べ、中和活性が著しく低下することが分かる。即ち、アミノ酸数の減少により中和活性は低下する傾向があり、なかでも、アミノ酸数が 3 個の No. 3 では中和活性を完全に消失した。

実施例 5 : 本発明ペプチド中、a 4 及び a 5 の中和活性に及ぼす影響

表 1 3 中、No. 1 のペプチドを陽性対照として用い、当該ペプチド中、a 4 のアミノ酸種類を同じ疎水性アミノ酸であるロイシンに代えたペプチド (No. 2)、またはプロリンに代えたペプチド (No. 3) を用い、これらの中和活性に及ぼす影響を実施例 1 と同様にして測定した。これらの結果を表 1 3 に併記する。

表 1 3

No.	アミノ酸の配列					抗 HIV 中和活性 ($\mu\text{g/ml}$)	
	a1	a2	a3	a4	a5	HTLV-IIIB	KK-1
1	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Ala	78.1	39.1
2	Tyr	Tyr	Lys	Leu	Leu	31.3	62.5
3	Tyr	Tyr	Lys	Pro	Pro	NE	NE

表 1 3 より、No. 1 において、a 4 及び a 5 のアミノ酸種類を本発明で特定するアミノ酸とは異なる種類に置換すると、中和活性が低下または消失すること

が分かる。これらの結果より、a 4 及び a 5 のアミノ酸種類は中和活性の発現に重要な影響を及ぼすことが示唆される。

実施例 6：本発明ペプチド中、A 4 及び A 5 の凝集能に及ぼす影響

表 1 4 中、No. 1 のペプチドを陽性対照として用い、当該ペプチド中、A 4 のアミノ酸の種類を同じ疎水性アミノ酸であるプロリンに代えたペプチド (No. 2)、または酸性アミノ酸であるアスパラギン酸に代えたペプチド (No. 3)；同様に、A 5 のアミノ酸の種類をプロリンに代えたペプチド (No. 4)、またはグルタミン酸に代えたペプチド (No. 5) を用い、これらの凝集能に及ぼす影響を実施例 2 と同様にして測定した。これらの結果を表 1 4 に併記する。表中、± は「痕跡程度」を意味する。

表 1 4

No.	アミノ酸の配列					凝集能
	A1	A2	A3	A4	A5	金コロイド標識 gp120
1	Asp	Val	Lys	Ala	Gly	+++
2	Asp	Val	Lys	Pro	Gly	—
3	Asp	Val	Lys	Asp	Gly	—
4	Asp	Val	Lys	Ala	Pro	—
5	Asp	Val	Lys	Ala	Glu	±

表 1 4 より、No. 1 において A 4 及び A 5 のアミノ酸の種類を異なるアミノ酸数に置換すると、凝集能は陰性か、若しくは殆ど痕跡程度に低下することが分かる。これらの結果より、A 4 及び A 5 のアミノ酸の種類は凝集能の重要な影響を及ぼすことが示唆される。

実施例 7：高分子化による中和活性に及ぼす影響

合成例 6 で作製した不活性アルカリホスファターゼ (A1p) 結合ペプチドの H I V 中和活性を、実施例 1 と同様にして測定した。尚、表 3 における No. 8 のペプチドを陽性対照とし、未反応な不活性アルカリホスファターゼを陰性対照

として用いた。これらの結果を表 1 5 に併記する。表中、NE は「陰性」を意味する。

表 1 5

		抗 HIV 中和活性 (μ g/ml)	
		HTLV-III B	KK-1
高分子化	不活性化 Alp 結合ペプチド	125-250	62.5
陽性対照	ペプチド	125	125
陰性対照	不活性化 Alp	NE	NE

表 1 5 より、本発明のペプチドを既知のタンパク質と結合させ、高分子化を図ることにより可溶性が高まり、中和活性も上昇することが分かる。

実施例 8 : 複数のペプチド導入による抗体分子様作用

ヒト血清中に、合成例 2 で作製したペプチド結合 α -サイクロデキストリンを懸濁し、市販の HIV 診断薬 (ダイナボット社製「HIV-1/HIV-2 EIA」) で検出できるか調べた。当該 HIV 診断薬の判定原理は、患者血清に形成された抗 HIV 抗体を検出するものであり、特に感染初期に出現する IgM 抗体を検出できることを特徴とするものである。その結果を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 に示す様に、HIV 患者血清中に存在する抗 HIV 抗体のみを検出する上記診断薬により、ヒト血清中に懸濁した HIV-gp120 に親和性を有するペプチドを複数個導入した結合 α -デキストリンを濃度依存的に検出できることが分かる。この結果より、本発明のペプチドが HIV に親和性を有すること、及び本発明ペプチドを複数個導入することにより、抗体様作用を示すことが明らかになった。

実施例 9 : gp120 に対する親和性 (1)

合成例 7 で作製したペプチド結合 Sephadex 6 MB を、予め種々の濃度に調整した西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) 標識 HIV-1-gp120 (Immuno Diagnostic 社) 及び酵素未標識 HIV-1-gp120 を夫々加え、

Schacherd Plot を作成することにより本発明ペプチドの解離定数 (k_d) を求めたところ、 $k_d = 2.14 \times 10^{-10} \text{ M}$ であった。

この結果より、本発明ペプチドは、抗体と同等か、若しくはそれ以上の親和性を有することが明らかである。

実施例 10 : gp120 に対する親和性 (2)

合成例 8 で作製したペプチド結合 Sephadex 4 B を、予め種々の濃度に調整した HRP 標識 HIV-1-gp120 (Immuno Diagnostic 社) 及び酵素未標識 HIV-1-gp120 を夫々加え、Schacherd Plot を作成することにより本発明ペプチドの解離定数 (k_d) を求めたところ、 $k_d = 4.97 \times 10^{-10} \text{ M}$ であった。

この結果より、本発明ペプチドは、抗体と同等か、若しくはそれ以上の親和性を有することが明らかである。

実施例 11 : gp120 の認識部位

本発明ペプチドの特異性を確かめる為に、表 1 の No. 1 及び表 3 の No. 6 のペプチドを、赤色ラテックスビーズ (ポリサイエンス社、直径 200nm) に標識した「ペプチド標識ラテックスビーズ」を作製した。このラテックスビーズ液 $20 \mu\text{l}$ に同量の偽 HIV-1 (gp120 標識金コロイド) 液を加えると、肉眼で、直ちに且つ容易に観察可能な赤色の凝集像を生じた。これに対し、金コロイドに標識していない未標識 gp120 液 ($1 \mu\text{g protein/ml}$) を加えても全く凝集しないことから、本発明ペプチドは、gp120 の唯一 1 力所の部位に結合することが推察された。尚、これらの結果を表 16 に示す。

表 16

凝集試験	金コロイド標識 gp120 タンパク質量 ($1 \mu\text{g/ml}$)	未標識 gp120 タンパク質量 ($1 \mu\text{g/ml}$)
表 1 の No. 1	有り	無し
表 3 の No. 6	有り	無し

実施例 12 : 特異性試験

実施例 7 で作製した 2 種類のペプチド (表 1 の No. 1 及び表 3 の No. 6) のラテックス凝集試験試薬「ペプチド標識ラテックスビーズ」を用い、他の病原ウイルスに対する非特異的吸着の有無を調べた。本実施例に用いたウイルスは、増悪期の C 型あるいは B 型肝炎患者から採取した血清、実験室株、新鮮分離株等である。また、ウイルス lysate は、予め金コロイドに標識して使用した。使用したウイルスの感染力価若しくは数、及び凝集の有無を表 17 に示す。

表 17

番号	試料/ウイルス名	titer or 数	凝集の有無	
			表 1 No. 1	表 3 No. 6
1	HIV-1 IIIB	1.0×10^5 TCID ₅₀	+	+
2	HIV-1 Lav 1	1.0×10^5 TCID ₅₀	+	+
3	HIV-1 kk-1	$1.0 \times 10^{4.5}$ TCID ₅₀	+	+
4	HIV-2 Lav 2	1×10^6 TCID ₅₀	-	-
5	C 型肝炎患者血清	不明	-	-
6	B 型肝炎患者血清	不明	-	-
7	Hepatitis B surface antigen(HbsAg)	1.6×10^5 units	-	-
8	Varicella Zoster Virus	9.5×10^5 units	-	-
9	Argubella Zoster Virus (VZV)	4.9×10^5 units	-	-
10	HTLV-1 virul lysate	1.1×10^5 units	-	-
11	human cytomegalovirus (HCMV)	5.5×10^5 units	-	-
12	Epstein-Barr virus (EB virus)	9.9×10^5 units	-	-

表 17 より、本発明のペプチドによる gp120 に対する親和性は HIV-1 に特異的であることが分かる。

実施例 13 : HIV 吸着カラムによる血清中の HIV の除去

合成例 9 で作製した本発明ペプチド/Sephrose 4B 担体を用い、HIV-1

の吸着除去能について検討した。尚、上記担体に標識された本発明ペプチドの導入量は、ベッド容量1mL当たり約5mgであった。

まず、予めPBS緩衝液(pH7.2)に懸濁した上記吸着体100 μ l(1容)をテストチューブに入れた後、121℃で30分間高压滅菌し、自然減圧したものを供試担体とした。また、偽HIV-1ウイルスモデルとして、gp120のタンパク質量を1.5mg/mLに調整したgp120標識金コロイド液を使用した。この偽HIV液を、100%ヒト血清に懸濁したもの(血清最終のうど96%)を供試ウイルス液とし、一方、同濃度の偽HIV液をPBS緩衝液に懸濁したもの(pH7.2, 血清濃度0%)を対照液とした。抗体1容(100 μ l)に対し、供試ウイルス液24容(2.4mL)をテストチューブに添加し、37℃に設定した恒温水槽で2時間浸透懸話した。反応終了後、このテストチューブを取り出して室温に静置し、30分後、上澄み液を偽ウイルス未吸着サンプルとして採取した。この様にして得られたサンプルの540nmにおける吸光度を比色し、血清濃度0%での吸着率100%としたときの、血清濃度94%の吸着率を算出した。これらの結果を表18に示す。

表18

血清濃度 (%)	吸着率 (%)
0	100
94	74

実施例14：HIV吸着カラムによる血清中のHIVの除去

合成例7で作製した本発明ペプチドで標識されたセルロース系担体を使って、HIV-1の吸着除去について検討した。ここでこの担体に標識された本発明のペプチドの導入量は、ベッド容量1mL当たり約5mgであった。

まず、予めPBS緩衝液(pH7.2)に懸濁した上記吸着体100 μ l(1容)をテストチューブに入れた後、121℃で30分間高压滅菌し、自然減圧したものを供試カラムとした。一方、HIV-1ウイルス液は、国内エイズ患者か

ら大竹ら（感染症雑誌，64:1284-1294，1990）が新鮮分離し、凍結保存した k k - 1 株を用いた。この k k - 1 株（ 1×10^5 TCID₅₀）を急速融解した後、超遠心機にかけ、予め非動化した培養用 100% ヒト血清に懸濁したものを供試ウイルス液とした。次に、カラム中の担体 1 容に対して、供試ウイルス液 2.4 容をカラムに流した。添加終了後、カラムに残った未反応ウイルスを洗浄する為に、担体の 5 倍容の正常ヒト血清を流した。尚、ウイルス量の測定は、p24 Antigen ELISA Kit (Cellular products Inc.) を用いて測定し、キットに添付された計算式により Cut off 値を求め、S/C0 を算出した。測定した試料は、供試試料（ウイルス液）、素通り試料、洗浄液、及び担体を可溶化して抽出した液（カラム吸着画分）であり、カラム素通り各部画分は、このうち素通り試料及び洗浄液を含む画分とした。これらの結果を表 19 に示す。

表 19

	p24 (S/C0)
ウイルス液 (Starting material)	2.350
カラム未吸着画分（カラム素通り液）	2.209
カラム吸着画分	205

表 19 より、供試ウイルス量の約 10% 弱が、カラムに吸着したことが分かる。尚、本実施例において、ウイルス量を評価するのに上記の p 24 量を測定する方法を採用した理由について述べる。

本実施例では、ウイルス液として患者の状態に最も近いと思われる 100% ヒト血清に懸濁した新鮮分離株 K K - 1 株を用いたが、その量を正確に評価することは極めて困難である。g p 120 ELISA Kit は実験室株に使用しても、H I V - 1 の様な新鮮分離株には使用できない。むしろ、これがこのウイルス株を使った理由でもある。従って、一次構造上コンセンサスな配列を持つコアタンパク質である p 24 量を E I A 法で測定するか、或いは、R T - P C R 法で想定することが考えられるが、これらの方法はいずれも、分解物も含んで測定してしまう

という欠点がある。前述の様に、H I Vそのものが極めて不安定であり、操作中にも分単位で壊れていく為、実験に使ったウイルス液中には、ウイルス分解物が存在するのみならず、該分解物が操作中に益々増加していることも考えられるので、これらの方法を採用し、吸着量に比べ分解物の増加量が多ければ、その結果が判らないものとなる。従って、ウイルス量を正確に判定するには、感染実験による判定が望ましい。しかし、本実施例で使用した新鮮分離株KK-1は、H I V-1 III B等の実験室株の様に感染が容易でないこと、とりわけ感染実験には、カラム吸着量を遙かに超える位の、非常に高濃度のウイルス液が必要であることを考慮すると、実験することは極めて困難である。そこで、ウイルス液を或る程度希釈しなければ吸着量も判りにくいことから、本実施例ではp 24量を測定することにし、他のデータと比較できる様にS / C Oを算出することにしたのである。

実施例15：ラテックス標識ペプチドによるH I Vの結合

表17のNo. 2のウイルス/No. 1のペプチド-ラテックスビーズによるH I Vの凝集の様子を電子顕微鏡で撮影した。詳細には、実験室株H I V-1 L A V 1に上記凝集試験薬を加えて凝集させた後、4℃で6時間放置した。次いで、この凝集液を電子顕微鏡支持膜に載せて、酢酸ウラニルでネガティブ染色した後、観察した。参考までに、この電子顕微鏡写真をFig. 2に示す。

Fig. 2より、H I Vウイルスは、H I V-g p 1 2 0親和性ペプチドを標識したラテックスビーズに強固に結合し、それらのビーズ同士を強固に結合して凝集していることが分かる。

産業上の利用可能性

上述した通り、本発明のペプチドはg p 1 2 0に対し、安定して優れた親和性を有するものであり、従来の抗体分子に匹敵するだけの中和活性を持った抗H I V剤として、その凝集能を用いたH I V診断薬として、更には、抗体分子にない物理的な安定性を活用した、高圧滅菌を必要とするH I V除去用デバイス等の医療用具として、極めて有用である。